

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2619885号

(45)発行日 平成9年(1997)6月11日

(24)登録日 平成9年(1997)3月11日

(51)Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 3/06			C 1 2 M 3/06	
C 1 2 N 5/06			C 1 2 N 5/00	E

発明の数2(全 5 頁)

(21)出願番号	特願昭62-278042	(73)特許権者	999999999 テルモ株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
(22)出願日	昭和62年(1987)11月2日	(73)特許権者	999999999 吉里 勝利 神奈川県海老名市大谷40-1-518
(65)公開番号	特開平1-120278	(72)発明者	吉里 勝利 神奈川県海老名市大谷40-1-518
(43)公開日	平成1年(1989)5月12日	(72)発明者	牧野 綾子 静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内
		(72)発明者	片倉 健男 静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内
		(74)代理人	弁理士 鈴江 武彦 (外2名)
		審査官	河野 直樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞培養方法およびその装置

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】培養すべき細胞を培地およびコラーゲンゲルと混合して混合液を調製する工程と、得られた混合液を物質交換膜で囲まれた中空糸内部に封入する工程と、中空糸の外側に灌流液を循環させることにより、培養に必要な物質を前記物質交換膜を通して前記中空糸内部に導入すると共に、前記細胞から分泌された代謝産物を前記物質交換膜を通して還流液中に取り出す工程とを具備したことを特徴とする細胞培養方法。

【請求項2】前記灌流液を循環させるに際し、灌流液中に酸素を供給するようにしたことを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の細胞培養方法。

【請求項3】物質交換膜により隔てられた中空糸内部および中空糸外側と、前記中空糸内部に封入された培養すべき細胞、コラーゲンゲル及び培地と、前記中空糸外側

2

に満たされた灌流液と、該灌流液を交換するために前記中空糸外側に設けられた灌流液交換口とを具備したことを特徴とする細胞培養装置。

【請求項4】前記物質交換膜が、孔径5A~1μmの貫通孔を有する多孔質膜であることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載の細胞培養装置。

【請求項5】前記中空糸外側には灌流液の入口および出口が設けられ、この入口および出口を介して灌流液が中空糸外側の内部と外部循環路との間を循環するようにしたことを特徴とする特許請求の範囲第3項または第4項に記載の細胞培養装置。

【請求項6】前記灌流液が循環される外部循環路に、酸素を灌流液中に供給するためのガス交換器を設けたことを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載の細胞培養装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【産業上の利用分野】

本発明は細胞培養装置および細胞培養方法に関する。より具体的には、繊維芽細胞、平滑筋細胞あるいは脳細胞等の間質系細胞や、肝細胞、脾細胞、神経細胞、内皮細胞、上皮細胞等の付着依存性細胞、及びリンパ球、顆粒球、単球等の血液細胞を効率良く培養するための高密度培養に係る。

## 【従来の技術】

細胞の大量培養法として従来最も一般的に行なわれているのは、浮遊培養法である。この方法では、培養細胞を培地溶液中に浮遊させて攪拌しながら培養する。しかし、既述の高機能細胞は付着依存性が強いので、浮遊培養法を適用しても細胞は培養容器の内面に付着して浮遊せず、所期の培養効率が得られない。そこで、これら高機能細胞に対する浮遊培養法の適用に際して適当なビーズを担体に用い、該ビーズ表面に細胞を付着させた状態で培地中に浮遊させる手段が用いられている。

ところが、上記浮遊培養法では攪拌や暴風操作を必要とし、生活環境が乱されるため細胞の活性低下を生じる欠点がある。また、培地を回収して再利用したり、その中に含まれる有用成分を単離するためには、細胞と培地を分離するために遠心分離等の複雑な操作を必要とする欠点がある。

上記の浮遊培養法の他、動物細胞の大量培養法としては分離膜表面での培養法が行なわれている。例えば、中空型物質交換装置における中空糸外面での細胞培養が報告されている (Knazek R.A. et al; Cell culture on artificial capillaries. An approach to tissue growth in vitro.; SCIENCE, vol.178,65,1972)。しかし、この方法では分離膜表面を細胞の付着場所としているため、分離膜の表面積がそのまま培養可能な有効面積となる。このため、大量培養のためには大きな膜面積が (例えば中空糸の本数増加) が必要となり、装置が大がかりなものになってしまう欠点がある。

また、細胞活性を高く維持したまま高密度の培養が可能な方法として、コラーゲンゲル内での培養が知られている。コラーゲンは生体内に豊富に存在する細胞間物質で、その細胞生着に対する適性については既に種々の確認がなされており、細胞培養基質として市販されるに至っている。更に、コラーゲンのゲル内に細胞を封入して培養を行なうと三次元的に立体培養が行なわれ、且つ細胞の機能亢進が認められることが報告されている (例えば、榎並淳平「マウス乳癌上皮細胞、乳癌細胞のコラーゲン・ゲル培養」、組織培養研究vol.4, no.1, p76, 1985)。従って、この方法によれば活性を高く維持したまま細胞密度を高めることが可能となる。

しかし、このゲル内培養においては、細胞への栄養補給並びに細胞から分泌された代謝産物の排出が何れもゲル内の物質拡散により行なわれるため、物質代謝の効率

が悪い問題がある。また、ゲルの厚さが増大すると、栄養補給および代謝産物排出の速度が低下して培養効率が悪くなる問題がある。このため、長期に亘る安定な大量培養には適さない問題がある。

## 【発明が解決しようとする問題点】

上記事情に鑑み本発明が達成しようとする課題は、付着依存性の強い高機能細胞を、細胞活性を低下することなく、長期に亘って安定かつ高密度で大量培養できる高効率の培養装置および培養方法を提供することである。

## 【問題点を解決するための手段】

上記の課題を解決するために本発明が提供する培養装置は、物質交換膜により隔てられた第一室および第二室と、前記第一室に封入された培養すべき細胞、コラーゲンゲル及び培地と、前記第二室に満たされた灌流液と、該灌流液を交換するために前記第二室に設けられた灌流液交換口とを具備したことを特徴とするものである。

また、本発明による細胞培養方法は、培養すべき細胞を培地およびコラーゲンゲルと混合して混合液を調製する工程と、得られた混合液を物質交換膜で囲まれた培養室内に封入する工程と、該培養室の外側に灌流液を循環させることにより、培養に必要な物質を前記物質交換膜を通して前記培養室内に導入すると共に、前記細胞から分泌された代謝産物を前記物質交換膜を通して灌流液中に取出す工程とを具備したことを特徴とするものである。

## 【作用】

以下、必要な作用説明を含めて本発明の詳細を説明する。

本発明において、培養すべき細胞をコラーゲンゲルと共に細胞室に封入すると、細胞が封入された比較的薄くて均一なコラーゲンゲル層が形成される。即ち、本発明ではコラーゲンゲル内で細胞の立体培養が行なわれることになる。従って、三次元培養による高密度の培養が行なわれ、且つ細胞の機能亢進が誘導される。しかも、本願発明における培養環境は、物質交換膜を新鮮な灌流液と接触している。従って、培養環境と灌流液との間には膜中の細孔を通して活発な物質交換が行なわれ、細胞への栄養補給および細胞から分泌される老廃物等の除去が迅速かつ効率よく行なわれる。このため、長期間培養しても培養効率は低下せず、安定な大量培養が可能となる。

本願発明における物質交換膜としては、透析膜、濾過膜等を用いることができる。物質交換膜の最も重要な要素は膜を通過する細孔の孔径である。その下限は所望の物質が透過し得る大きさであり、また上限は封入された細胞が漏出ししない大きさである。具体的には、約5 Å～1 μm程度である。

本発明においては、人工腎臓あるいは人工肺として既に実用化されている物質交換装置を好適に利用することができる。これらの物質交換装置としては、中空糸型の

装置を用いるのが好ましいが、ここでいう中空糸は平膜フィルター2枚を重ね、その周縁部をシールしたものであってもよい。

第1図は、中空糸型物質交換装置の外観を示す図である。同図において、1は円筒状のハウジングである。ハウジング1の両開口端には、下部蓋体2および上部蓋体3が螺着されている。下部蓋体2には血液導入口4が、上部蓋体3には血液導出口5が夫々設けられている。また、ハウジング1には透析液または酸素源ガスの入口6および出口7が設けられている。更に、ハウジング1の内部には多孔質ポリマーからなる中空糸(図示せず)が多数配設されている。これら中空糸の下端は一つに纏められて血液導入口4に連通され、上端は同様にして血液導出口5に連通されている。ハウジング1の内部で且つ中空糸の外側の空隙(ハウジング空間)は、ハウジング1に設けた入口6および出口7に連通している。例えば人工腎臓の場合、中空糸内部を通して患者の血液を循環させると共に、透析液をハウジング空間に循環させる。これにより、血液に含まれる尿素等の老廃物が中空糸を構成する物質交換膜を介して透析される。人工肺として用いる場合には、透析液の代りに酸素濃度の高いガスをハウジング空間内に循環させ、血液中の炭酸ガスとの間でガス交換を行なわせる。

上記の中空糸型物質交換装置を用いて本発明を実施する場合には、培養すべき細胞を適当な培地およびコラーゲンゲルと混合し、これを血液導入口4から中空糸内部に圧入して封入する。次いで、灌流液を入口6および出口7からハウジング空間内に循環させる。第1図(B)は、このときの中空糸の状態を拡大して示している。同図において、8は中空糸を構成する多孔質膜である。実用されている中空糸の孔径は約200 $\mu$ m前後で、膜を貫通する細孔の孔系は20 $\text{\AA}$ ~0.6 $\mu$ m程度である。中空糸の内部にはコラーゲンゲル9が充填され、その中に培養すべき細胞10が分散されている。中空糸の外側の矢印は、ハウジング空間中の灌流液の流れを示している。この灌流液と中空糸内部の培養環境との間には、図中矢印で示すように培養に必要な物質交換が行なわれ、培養効率を高める。

平膜型の人工腎臓等では、中空糸の代りに、第2図(A)に示すような平膜フィルター11が用いられる。第2図(B)は、平膜フィルター11の一部断面を拡大して示している。平膜フィルター11の平面形状は、中央に貫通孔12を有するドーナツ状になっている。この平膜フィルターは、二枚の多孔質ポリマー膜13,14の間に目の粗い織布15を挟み込み、内周および外周をヒートシール部16,17で封着して構成されている。目の粗い織布15は、多孔質ポリマー膜13,14の間に流体通路となる間隙を保持する間隙保持材としての機能を有している。また、血液をフィルター内部の流体通路内に循環させるために、二つの貫通孔18,19が設けられている。この平膜フィル

ター11を、適当なハウジング内に多数収納することにより、フィルター内部の流体流路からなる血液循環路が形成され、またフィルターの外側には透析液等を循環させるハウジング空間が形成される。この平膜型物質交換装置の場合にも、平膜フィルター11の内部を培養室として用いることにより、中空糸型物質交換装置の場合と同様にして本発明を実施することができる。

本発明において、コラーゲンゲルとしては一般に市販されているものを使用できる。一例としては、アテロコラーゲン(高研株式会社製)が挙げられる。

本発明における灌流液としては、対象となる細胞の培養に適した培地を用いることができる。例えば、下記組成のグリーン氏培地(Rheinwald J.G. and Green H., Cell 1 vol.6, 331~334, (1975))が挙げられる。

DE	67.5%
H am F-12	22.5%
Fetal Calf Serum	10 %
ハイドロコチゾン	0.4 $\mu$ g/ml
インスリン	5 $\mu$ g/ml
トランスフェリン	5 $\mu$ g/ml
T <sub>3</sub>	2 $\times 10^9$ M
コレラトキシン	10 $^{-10}$ M
アデニン	8 $\times 10^{-4}$ M
Epidermal Growth Factor	10 ng/ml
ペニシリンG	100 単位/ml
ストリプトマイシン	100 ng/ml
重ソウ	10 mM
H epes	20 mM

但し、「DE」はDulbecco's modified Eagle's medium, 「H am F-12」はNutrient mixture F-12を表わす。

灌流液を循環させて使用する場合には、循環路中にガス交換装置を設けて灌流液に酸素を補給するのが望ましい。

本発明によれば、各種臓器等の高機能細胞を活性低下を伴うことなく高密度で培養できるため、例えば人工肝臓等のような人工臓器としての応用が期待される。即ち、上述した方法で肝細胞を物質交換装置内に高密度に培養した後、灌流液の代りに血液をハウジング空間内に循環させれば、血液中の有毒物質を肝細胞に代謝分解させて解毒を行なうことができる。同様に、人工内分泌腺等としての応用にも期待がもたれる。

#### 〔実施例〕

以下に、本発明の効果を実証するために行なった実施例および比較例を説明する。

#### 実施例

Sprague-Dawley rat (雄, 5~8週令) からSeglenの方法に準じて分離した肝細胞 $4.4\times 10^6$  cellsを、4 $^{\circ}$ Cに冷却したグリーン氏培地およびアテロコラーゲンと混合することにより、アテロコラーゲン濃度0.2%の混合液5

0mlを調製した。これを中空糸型物質交換装置の中空糸内に充填した。中空糸型物質交換装置としては、テルモ株式会社製の膜型人工肺（商品名「キャビオックスII-08」）の熱交換部分を取除いたガス交換部分を用いた。この物質交換装置は、約13,000本のポリプロピレン製中空糸（内径200 $\mu$ m、有効長12.5cm）で構成されている。

次いで、第3図に示す装置を組み立てて培養を行なった。同図において、21は上記のようにしてコラーゲンゲル中に分散した肝細胞を充填した中空糸型物質交換装置である。この物質交換装置のハウジング空間に、ポンプ22を用いて液容器23に満たしたグリーン氏培地を灌流した。また、灌流液の酸素分圧を高めるために循環路の途中にガス交換器24を設け、灌流液に酸素を供給した。ガス交換器24には既述したのと同じ中空糸型物質交換装置である。その中空糸内部に灌流液を循環させると共に、混合ガス（40%O<sub>2</sub> + 55%N<sub>2</sub> + 5%CO<sub>2</sub>）をハウジング空間に循環させることにより酸素供給を行なった。なお、培養温度は37℃とした。

7日間培養した後に細胞の状態を観察したところ、ゲル内のいたる所で細胞の活発な伸展が認められた。比較例

実施例と同様にして肝細胞4.4×10<sup>5</sup> cellsの含む混合液を調製し、この5mlを直径35mmのプラスチックシャーレに分注した。37℃のインキュベータ中に収納し、50% O<sub>2</sub> + 45% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> のガス雰囲気下に培養を行なった。

\*

\* 培養7日目に細胞の状態を観察したところ、ゲルの表面では細胞の活発な伸展が認められたが、ゲル中央部では死滅細胞が多数認められた。

〔発明の効果〕

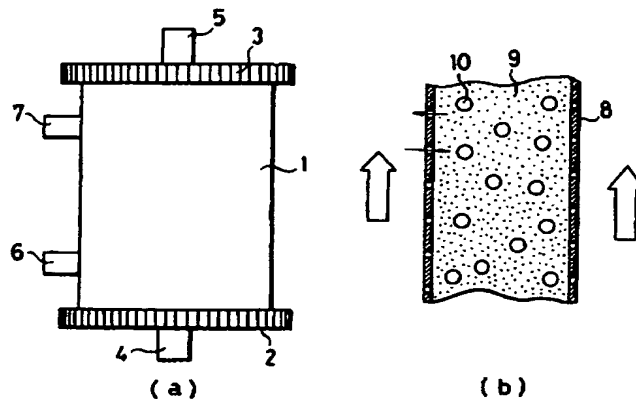
以上詳述したように、本発明によれば付着依存性の強い高機能細胞を、細胞活性を低下することなく、長期に亘って安定かつ高密度で大量培養できる。また、本発明は培養細胞による人工臓器の可能性にも途を拓く等、顕著な効果を奏する。

#### 10 【図面の簡単な説明】

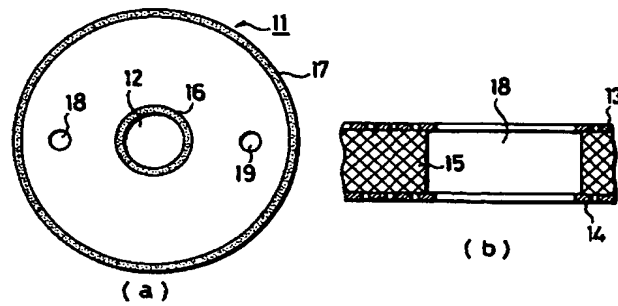
第1図（A）は本発明の実施に好適に使用できる中空糸型物質交換装置を示す図、第1図（B）は第1図（A）の物質交換装置を用いて本発明を実施したときの培養状態を拡大して示す断面図、第2図（A）は本発明の実施に好適に使用できる平膜型物質交換装置の平膜フィルターを示す平面図であり、第2図（B）はその一部を拡大して示す断面図、第3図は本発明の一実施例を示す説明図である。

1……ハウジング、2,3……蓋体、4……血液導入口、5……血液導出口、6……ハウジング空間入口、7……ハウジング空間出口、8……多孔質ポリマーの中空糸、9……コラーゲンゲル、10……細胞、11……平膜フィルター、12……中央孔、13,14……多孔質ポリマー膜、15……隙間保持部材、16,17……ヒートシール部、18,19……貫通孔、21……細胞培養器、22……ポンプ、23……灌流液容器、24……ガス交換器

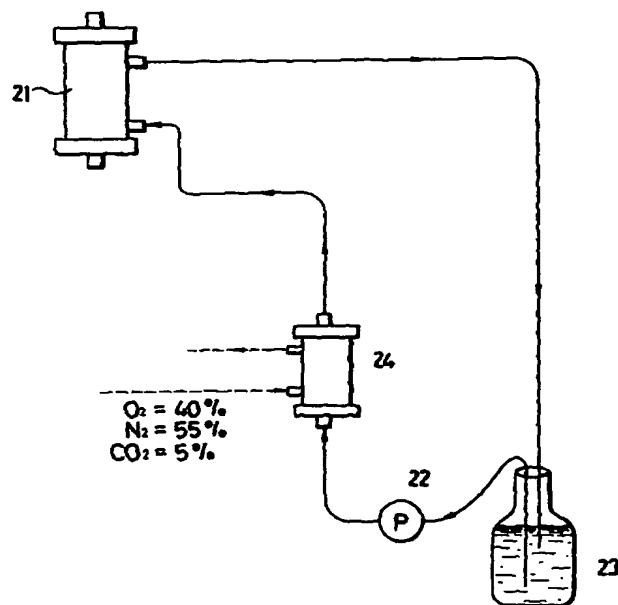
【第1図】



【第2図】



【第3図】



フロントページの続き

(72)発明者 森 有一  
 静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ  
 株式会社内

(56)参考文献 特開 昭62-215386 (J P, A)  
 米国特許4220725 (U S, A)

[JP,2619885,B]

---

CLAIMS DETAILED DESCRIPTION TECHNICAL FIELD PRIOR ART EFFECT OF THE  
INVENTION TECHNICAL PROBLEM MEANS OPERATION EXAMPLE DESCRIPTION OF  
DRAWINGS DRAWINGS

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

(57) [Claim(s)]

[Claim 1] The cell culture method characterized by providing the following. The process which mixes with a culture medium and collagen gel the cell which should be cultivated, and prepares mixed liquor. The process which encloses the obtained mixed liquor with the interior of the hollow filament surrounded by the matter exchange film. The process which takes out in reflux the metabolite secreted from the aforementioned cell through the aforementioned matter exchange film while introducing the matter required for cultivation into the interior of the aforementioned hollow filament through the aforementioned matter exchange film by making the outside of a hollow filament circulate through the perfusate.

[Claim 2] The cell culture method given in the 1st term of a patent claim characterized by making it face to circulate through the aforementioned perfusate and supplying oxygen into the perfusate.

[Claim 3] Cell culture equipment characterized by providing the interior of a hollow filament and the hollow-filament outside which were separated with the matter exchange film, the cell, the collagen gel and the culture medium which were enclosed with the interior of the aforementioned hollow filament, and which should be cultivated, the perfusate filled on the aforementioned hollow-filament outside, and the perfusate exchange mouth prepared in the aforementioned hollow-filament outside in order to exchange this perfusate.

[Claim 4] Cell culture equipment given in the 3rd term of a patent claim characterized by the aforementioned matter exchange film being a porous membrane which has an aperture 5A-1 micrometer breakthrough.

[Claim 5] Cell culture equipment given in the 3rd term of a patent claim or the 4th term characterized by the entrance and outlet of the perfusate being established in the aforementioned hollow-filament outside, and making it the perfusate circulate through between the interior of a hollow-filament outside, and external circuits through this entrance and outlet.

[Claim 6] Cell culture equipment given in the 5th term of a patent claim characterized by forming the gas exchange machine for supplying oxygen into the perfusate in the external circuit through which the aforementioned perfusate circulates.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

#### [Industrial Application]

this invention relates to cell culture equipment and the cell culture method. The high density cultivation for cultivating efficiently blood cells, such as adhesion dependency cells, such as stromata system cells, such as a fibrocyte, a smooth muscle fiber, or a brain cell, and a hepatocyte, a pancreatic cell, a nerve cell, an endothelial cell, an epithelial cell, and a lymphocyte, a granulocyte, and a monocyte, is started in condition.

#### [Description of the Prior Art]

Former most generally as a mass-culture method of a cell, the suspension culture method is carried out. It cultivates by this method, making a cultured cell float in a culture-medium solution, and agitating it. However, since a highly efficient cell as stated above has the strong adhesion dependency, even if it applies a suspension culture method, to the inside of a cultivation container, a cell adheres, and does not float, and expected cultivation efficiency is not acquired. Then, a suitable bead is used for support on the occasion of the application of a suspension culture method to these highly efficient cells, and the means made to float in a culture medium in the state where the cell was made to adhere to this bead front face is used. However, by the describing [ above ] suspension culture method, churning and \*\*\*\* operation are needed, and since a living environment is disturbed, there is a fault which produces the activity fall of a cell. Moreover, in order to collect and reuse a culture medium, or to isolate the useful component contained in it, and to separate a cell and a culture medium, there is a fault which needs complicated operation of centrifugal separation etc.

As a mass-culture method of an animal cell besides the above-mentioned suspension culture method, cultivation on the front face of a demarcation membrane is performed. For example, the cell culture in the hollow-filament superficies in a hollow type matter swap device is reported (65 Knazek R.A.et al;Cell culture on artificial capillaries.An approach to tissue growth in vitro.;SCIENCE, vol.178, 1972). However, by this method, since the demarcation membrane front face is made into the adhesion place of a cell, the surface area of a demarcation membrane turns into effective area which can be cultivated as it is. For this reason, the big film surface product (for example, increase in a number of a hollow filament) for a mass culture is needed, and there is a fault from which equipment will become large-scale.

Moreover, cultivation within collagen gel is known as a method in which high-density cultivation is possible, maintaining cell activity highly. Are the intercellular substance which exists abundantly in the living body, various checks are already made about the fitness over the cell take, and a collagen has come to be marketed as a cell culture substrate. Furthermore, it is reported that a three dimensional culture will be performed in three dimensions if it cultivates by enclosing a cell in the gel of a collagen, and the hyperergasia of a cell is accepted (76 1 4 for example, Junpei Enami "collagen gel cultivation of a mouse breast cancer epithelial cell and cancer cells of breast carcinoma", tissue culture research vol. no. p 1985). Therefore, it becomes possible to raise cell density, maintaining activity highly according to this method. However, in the cultivation in this gel, since each eccrisis of the metabolite secreted from the alimentation and the cell to a cell is performed by the matter diffusion in gel, there is a problem



that the efficiency of metabolism is bad. Moreover, when the thickness of gel increases, there is a problem to which the speed of alimentation and metabolite excretion falls, and cultivation efficiency becomes bad. For this reason, there is a problem which is not suitable in the stable mass culture over a long period of time.

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

The technical problem which this invention tends to attain in view of the above-mentioned situation is offering the efficient culture apparatus and the cultivation method of continuing at a long period of time, and it being stable and high-density and carrying out the mass culture of the strong highly efficient cell of an adhesion dependency, without falling cell activity.

[Means for Solving the Problem]

The culture apparatus which this invention offers in order to solve the above-mentioned technical problem is characterized by providing the cell, the collagen gel and the culture medium which were enclosed with the first room separated with the matter exchange film and the second room, and the first aforementioned room and which should be cultivated, the perfusate filled by the second aforementioned room, and the perfusate exchange mouth prepared in the second aforementioned room in order to exchange this perfusate.

Moreover, the process which the cell culture method by this invention mixes with a culture medium and collagen gel the cell which should be cultivated, and prepares mixed liquor, While introducing the matter required for cultivation into the aforementioned cultivation interior of a room through the aforementioned matter exchange film the process which encloses the obtained mixed liquor with the cultivation interior of a room surrounded by the matter exchange film, and by making the outside of this cultivation room circulate through the perfusate It is characterized by providing the process which takes out in the perfusate the metabolite secreted from the aforementioned cell through the aforementioned matter exchange film.

[Function]

Hereafter, the details of this invention including required operation explanation are explained. In this invention, if the cell which should be cultivated is enclosed with a cell room with collagen gel, the comparatively thin and uniform collagen gel layer with which the cell was enclosed will be formed. That is, in this invention, the three dimensional culture of a cell will be performed within collagen gel. Therefore, high-density cultivation by three-dimensions cultivation is performed, and the hyperergasia of a cell is guided. And the cultivation environment in the invention in this application touches the fresh perfusate in the matter exchange film. Therefore, between cultivation environment and the perfusate, active matter exchange is performed through the pore in a film, and removal of the wastes secreted from the alimentation and the cell to a cell is performed quickly and efficiently. For this reason, even if it cultivates for a long period of time, cultivation efficiency does not fall but the stable mass culture of it becomes possible.

A permeable membrane, a filtration membrane, etc. can be used as a matter exchange film in the invention in this application. The most important element of a matter exchange film is an aperture of pore which passes a film. The minimum is the size which the desired matter may penetrate, and an upper limit is a size which the enclosed cell does not leak. Specifically, it is about 5A – about 1 micrometer.

In this invention, the matter swap device already put in practical use as an artificial kidney or an artificial lung can be used suitably. Although it is desirable as these matter swap devices to use hollow-filament type equipment, a hollow filament here may pile up two flat film filters, and may carry out the seal of the periphery section.

A view 1 is drawing showing the appearance of a hollow-filament type matter swap device. In this drawing, 1 is cylinder-like housing. The lower lid 2 and the up lid 3 are screwed on both the openings edge of housing 1. The blood inlet 4 is formed in the lower lid 2, and the blood derivation mouth 5 is formed in up \*\*\*\*, respectively. Moreover, the entrance 6 and outlet 7 of dialysing fluid or the source gas of oxygen are established in housing 1. Furthermore, many hollow filaments (not shown) which consist of porosity polymer are arranged in the interior of housing 1. The soffit of these hollow filaments is summarized to one, and is opened for free passage by the blood inlet 4, and the upper limit is similarly opened for free passage by the blood derivation mouth 5. It is the interior of housing 1, and the opening (housing space) of the outside

of a hollow filament is open for free passage to the entrance 6 and outlet 7 which were established in housing 1. For example, while circulating a patient's blood through the interior of a hollow filament in the case of an artificial kidney, housing space is made to circulate through dialysing fluid. Thereby, wastes, such as a urea contained in blood, are dialyzed through the matter exchange film which constitutes a hollow filament. When using as an artificial lung, the high gas of an oxygen density is circulated in housing space instead of dialysing fluid, and a gas exchange is made to perform between the carbon dioxide gas in blood.

In carrying out this invention using the above-mentioned hollow-filament type matter swap device, the cell which should be cultivated is mixed with a suitable culture medium and collagen gel, and it presses fit and encloses this with the interior of a hollow filament from the blood inlet 4. Subsequently, the perfusate is circulated in housing space from an entrance 6 and an outlet 7. The view 1 (B) expands and shows the state of the hollow filament at this time. In this drawing, 8 is a porous membrane which constitutes a hollow filament. the hole of pore with which the aperture of the hollow filament currently used penetrates a film before and after about 200 micrometers -- a system is 20A -- about 0.6 micrometers The interior of a hollow filament is filled up with the collagen gel 9, and the cultivation \*\*\*\* power cell 10 is distributed in it. The arrow of the outside of a hollow filament shows the flow of the perfusate in housing space. Between this perfusate and the cultivation environment inside a hollow filament, as the arrow in drawing shows, matter exchange required for cultivation is performed, and cultivation efficiency is raised.

In a flat film type artificial kidney, the flat film filter 11 as shown in a view 2 (A) is used instead of a hollow filament. a view 2 (B) -- some flat film filters 11 -- the cross section is expanded and shown The flat-surface configuration of the flat film filter 11 is the shape of a doughnut which has a breakthrough 12 in the center. This flat film filter puts the textile fabrics 15 with a coarse eye among the porosity polymer films 13 and 14 of two sheets, seals inner circumference and a periphery in the heat-sealing sections 16 and 17, and is constituted. The textile fabrics 15 with a coarse eye have the function as gap maintenance material which holds the gap used as a fluid channel among the porosity polymer films 13 and 14. Moreover, in order to circulate blood in the fluid channel inside a filter, two breakthroughs 18 and 19 are formed. By containing a majority of these flat film filters 11 in suitable housing, the blood circulation way which consists of fluid passage inside a filter is formed, and the housing space which circulates dialysing fluid etc. is formed in the outside of a filter. this invention can be carried out like the case of a hollow-filament type matter swap device by using the interior of the flat film filter 11 as a cultivation room also in the case of this flat film type matter swap device.

In this invention, what is generally marketed as collagen gel can be used. As an example, atelocollagen (product made from quantity \*\*\*\*\*) is mentioned.

The culture medium which was suitable for cultivation of the target cell as perfusion liquid in this invention can be used. For example, the Green Mr. culture medium (Rheinwald J.G. and Green H., Cell vol.6,331-334, (1975)) of the following composition is mentioned.

DE 67.5% H am F-12 22.5% Fetal Calf Serum 10 % A hydrocortisone 0.4microg/ml Insulin 5 mug/ml Transferrin 5 mug/ml T3 2x10<sup>9</sup>M Cholera toxin 10-10M An adenine 8x10<sup>-4</sup>M Epidermal Growth Factor 10 ng/ml Penicillin G 100 Unit / ml strike RIFAMPIN mycin 100 ng/ml Heavy SOU 10 mM H epe 20 mM However, "DE" expresses Dulbecco's modified Eagle's medium and "H am F-12" expresses Nutrient mixture F-12.

When using it, circulating perfusion liquid, it is desirable to form gas exchange equipment all over a circuit, and to supply oxygen to perfusion liquid.

Since according to this invention it is high-density and highly efficient cells, such as various internal organs, can be cultivated, without being accompanied by activity fall, the application as artificial organs, such as an artificial liver, is expected. Namely, if blood is circulated in housing space instead of perfusion liquid after cultivating a hepatocyte with high density in a matter swap device by the method mentioned above, the poison can be counteracted by making a hepatocyte carry out metabolism decomposition of the toxic material in blood. Similarly, the application as an artificial endocrine gland etc. is also promising.

[Example]

Below, it is a book.

Example 50ml of mixed liquor of 0.2% of atelocollagen concentration was prepared by mixing hepatocyte  $4.4 \times 10^6$  cells separated from Sprague-Dawley rat (a male, five to 8 weeks old) according to the method of Seglen with the Green Mr. culture medium and atelocollagen which were cooled at 4 degrees C. It was filled up with this in the hollow filament of a hollow-filament type matter swap device. As a hollow-filament type matter swap device, the gas exchange portion which removed the heat-exchange portion of the membrane oxygenator (tradename "KYAPIOKKUSU II-08") by TERUMO CORP. was used. This matter swap device consists of about 13,000 hollow filaments made from polypropylene (the bore of 200 micrometers, 12.5cm of effective length).

Subsequently, it cultivated by constructing and building the equipment shown in a view 3. In this drawing, 21 is the hollow-filament type matter swap device filled up with the hepatocyte distributed in collagen gel as mentioned above. Perfusion of the Green Mr. culture medium which used the pump 22 for the housing space of this matter swap device, and filled in the liquid container 23 was carried out. Moreover, in order to raise the oxygen tension of the perfusate, the gas exchange machine 24 was formed in the middle of the circuit, and oxygen was supplied to the perfusate. It is the same hollow-filament type matter swap device as having mentioned already in the gas exchange vessel 24. While circulating the perfusate inside the hollow filament, oxygen supply was performed by making housing space circulate through mixed gas (40%O<sub>2</sub>+55% N<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>). In addition, cultivation temperature was made into 37 degrees C.

After cultivating for seven days, when the state of a cell was observed, active expansion of a cell was accepted in the everywhere in gel.

Example of comparison The mixed liquor which hepatocyte  $4.4 \times 10^5$  cells contains like an example was prepared, and these 5ml was poured distributively on the plastics petri dish with a diameter of 35mm. It contained in the 37-degree C incubator, and cultivated under the 50%O<sub>2</sub>+45% N<sub>2</sub>+5% atmosphere [ gas ] of CO<sub>2</sub>.

Although active expansion of a cell was accepted on the surface of gel when the state of a cell was observed on the 7th day of cultivation, many extinction cells were accepted in the gel center section.

#### [Effect of the Invention]

According to this invention, as explained in full detail above, without falling cell activity, it continues at a long period of time, and it is stable and high-density and the mass culture of the strong highly efficient cell of an adhesion dependency can be carried out. Moreover, remarkable effects -- this invention cultivates a way also in the possibility of the artificial organ by the cultured cell -- are done so.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

Drawing showing the hollow-filament type matter swap device which can use a view 1 (A) suitable for operation of this invention, The cross section expanding and showing a cultivation state when a view 1 (B) carries out this invention using the matter swap device of a view 1 (A), A view 2 (A) is a plan showing the flat film filter of the flat film type matter swap device which can be used suitable for operation of this invention, and the cross section which a view 2 (B) expands the part and is shown, and a view 3 are explanatory drawings showing one example of this invention.

1 [ .. A blood inlet, 5 / .. Blood derivation mouth, ] .... 2 Housing, 3 .. A lid, 4 6 [ .. The hollow filament of porosity polymer, ] .... A housing space entrance, 7 .. A housing space outlet, 8 9 .... collagen gel and 10 .. a cell and 11 .. a flat film filter and 12 .. a center -- a hole -- 13 14 [ .. 18 The heat-sealing section, 19 / .. A breakthrough, 21 / .. A cell culture machine, 22 / .. A pump, 23 / .. A perfusate container, 24 / .. Gas exchange machine ] .... A porosity polymer film, 15 .. 16 A crevice attachment component, 17

---

[Translation done.]